

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 48/00, 31/70, 9/127, 38/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/07824</p> <p>(43) 国際公開日 1997年3月6日(06.03.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02359</p> <p>(22) 国際出願日 1996年8月22日(22.08.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/245475 1995年8月29日(29.08.95) JP 特願平8/58467 1996年2月20日(20.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 森下竜一(MORISHITA, Ryuichi)(JP/JP) 〒532 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka, (JP) 荻原俊男(OGIHARA, Toshio)(JP/JP) 〒562 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka, (JP) 中村敏一(NAKAMURA, Toshikazu)(JP/JP) 〒569-11 大阪府高槻市高見台10-27 Osaka, (JP) 富田哲也(TOMITA, Tetsuya)(JP/JP) 〒561 大阪府豊中市曾根西町1-9-1B901 Osaka, (JP)</p>		<p>越智隆弘(OCHI, Takahiro)(JP/JP) 〒654 兵庫県神戸市須磨区須磨寺町1-3-7 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 中村敏夫(NAKAMURA, Toshio) 〒554 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友製薬株式会社 法務部内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: MEDICINE COMPRISING HGF GENE</p> <p>(54) 発明の名称 HGF遺伝子からなる医薬</p> <div data-bbox="422 1218 1055 1764"> <p>HGF濃度 (ng/ml)</p> <p>0.50 0.25 0.00</p> <p>無処置 対照 HGF</p> <p>b c</p> <p>a ... HGF concn. (ng/ml) b ... no treatment c ... control</p> </div> <p>(57) Abstract A medicine whereby HGF gene is applied for gene therapy with the use of liposomes. Compared with the administration of HGF per se, the medicine exhibits a long-lasting therapeutic effect and can act selectively on the affected part, which makes it possible to relieve the side effects of HGF.</p>		

Best Available Copy

(57) 要約

本発明は、HGF遺伝子をリボソームを用いて遺伝子治療的に適用する医薬に関する。本発明の医薬は、HGFそのものの投与に比べ治療効果が持続的であり、また局所選択的に作用させることができるため、HGFの副作用を低減することが可能である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BB	バハマ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GN	ギニア	MC	モナコ	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MD	モルドバ共和国	SZ	スワジランド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CF	コンゴ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CM	カメルーン	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
		KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

## 明 細 書

## H G F 遺伝子からなる医薬

## 5 発明の属する技術分野

本発明は遺伝子治療などに用いられる医薬に関する。さらに、詳しくはH G F (Hepatocyte Growth Factor) 遺伝子からなる医薬、及びH G F 遺伝子を含むリボソームに関する。

## 10 従来技術

H G F は様々な薬理作用を示す生理活性ペプチドであり、その薬理作用については、例えば実験医学 Vol. 10, No. 3 (増刊) 330-339 (1992)に記載されている。H G F はその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺繊維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤等(特開平 4-18028号公報、特開平 4-49246号公報、EP 4 92614 号公報、特開平 6-25010号公報、W O 93/8821、特開平 6-172207、特開平 7-89869号公報、特開平 6-40934号公報、W O 94/2165、特開平 6-40935号公報、特開平 6-56692号公報、特開平 7-41429号公報、W O 93/3061、特開平 5-2 13721 等)として有用である。

25 遺伝子治療に関しては、アデノシン・デアミナーゼ欠損症、A I D S 遺伝子治療、癌遺伝子治療、嚢胞性繊維症性遺伝子治療、血友病遺伝子治療等について現在活発な開発研究が国際的になされている。

しかし、H G F 遺伝子を用いた遺伝子治療についてはまだ知られておらず、また遺伝子治療が可能であるかについても不明であった。

### 発明が解決しようとする課題

HGFは血中半減期の短い薬物の1つである。従って、局所における持続的な投与が望まれていた。

5 また、HGFは多種多様の薬理作用を有することから、種々の治療剤としての開発が期待されている反面、その多種多様の薬理作用から全身的な投与では副作用が問題となることもありうる。また、HGFそのものを静脈内に投与すれば、かなりのHGFが肝臓に滞留するため、治療目的の臓器に到達する量が少なくなるという欠点がある。

### 課題を解決するための手段

本発明は前期課題を解決するためになされたものであり、その要旨は、

- (1) HGF遺伝子からなる医薬、
- (2) HGF遺伝子を含有するリボソーム、
- 15 (3) センダイウイルスと融合させた膜融合リボソームである上記(2)記載のリボソーム、
- (4) 上記(2)又は(3)記載のリボソームからなる医薬、
- (5) 動脈疾患治療剤である(1)又は(4)記載の医薬、及び
- (6) 軟骨傷害治療剤である(1)又は(4)記載の医薬に関する。

### 図面の簡単な説明

図1は、試験例1における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞でのHGFの発現を示す図である。

図2の折線グラフは、試験例2における、HVJ-リボソーム-contを感作した内皮細胞のHGF存在下又は非存在下における細胞増加率を示す図である。図中、HGFはHVJ-リボソーム-contを感作した内皮細胞群、HGFは所定濃度の組換えヒトHGFの存在下に培養した群を示す。図2の棒グラフは、試験例2における、HVJ-リボソーム-DNAを感作した内皮細胞

の細胞増加率を示す図である。図中、DSFはHVJ-リボソーム-cont  
を感作した内皮細胞群、HGFベクターはHVJ-リボソーム-DNAを感作  
した内皮細胞群を示す。

図3は、試験例2における、抗HGF抗体の存在下又は非存在下におけるH  
VJ-リボソーム-DNAを感作した内皮細胞の細胞増加率を示す図である。  
図中、対照はIgGコントロールの存在下に培養したHVJ-リボソーム-c  
ont感作内皮細胞群；HGFはIgGコントロールの存在下に培養したHV  
J-リボソーム-DNA感作内皮細胞群；HGFabはウサギ抗ヒトHGF抗  
体の存在下に培養したHVJ-リボソーム-DNA感作内皮細胞群を示す。な  
お、増加率(%)は、対照の増加率を100とした相対%で示した。

図4は、試験例3における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット  
VSMCの培養上清のラット冠動脈内皮細胞に対する細胞増殖効果を示す図で  
ある。図中、対照はHVJ-リボソーム-contを感作したラットVSMC  
の培養上清を添加した群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラ  
ットVSMCの培養上清を添加した群である。

図5は、試験例3における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット  
VSMCの培養上清のHGF濃度を、抗ヒトHGF抗体を用いて測定した結果  
を示す図である。図中、無処置は非感作VSMCの培養上清群；対照はHVJ  
-リボソーム-contを感作したラットVSMCの培養上清群；HGFはH  
VJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清群である。

図6は、試験例3における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット  
VSMCの培養上清のHGF濃度を、抗ラットHGF抗体を用いて測定した結  
果を示す図である。図中、無処置は非感作VSMCの培養上清群；対照はHV  
J-リボソーム-contを感作したラットVSMCの培養上清群；HGFは  
HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清群である。

図7は、試験例4における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット  
冠動脈内皮細胞の培養上清のラット冠動脈内皮細胞に対する細胞増殖効果を示

す図である。図中、AはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；BはHVJ-リボソーム-contを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；Cは無処置群である。

5 図8は、試験例4における、抗HGF抗体の存在下での、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清のラット冠動脈内皮細胞に対する細胞増殖効果を示す図である。図中、AはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；BはHVJ-リボソーム-contを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；CはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清に抗HGF抗体を添加した群；DはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清にコントロール抗体を添加した群である。

10 図9は、試験例5における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したヒトVSMCと非感作ヒト内皮細胞を共培養したときの内皮細胞の細胞増加を示す図である。図中、対照はHVJ-リボソーム-contで感作したVSMCとの共培養群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAで感作したVSMCの培養上清群である。

15 図10は、試験例6における、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCと非感作ラット冠動脈内皮細胞を共培養したときの内皮細胞の細胞増加を示す図である。図中、対照はHVJ-リボソーム-contで感作したVSMCとの共培養群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAで感作したVSMCの培養上清群である。

20 図11は、試験例8における、HVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋の微小血管数の増加を示す図である。図中、HGFはHVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋の微小血管数、対照はHVJ-リボソーム-contを直接注入したラット心筋の微小血管数である。

25 図12は、試験例9における、HVJ-リボソーム-DNAの関節内への投与後3週でのトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を

認める軟骨様細胞の出現を示す図である。

図13は、試験例9における、HVJ-リボソーム-DNAの関節内への投与後4週でのトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞の出現を示す図である。

図14は、試験例9における、比較例2で作製したHVJ-リボソーム-DNA (TGF- $\beta$ ) の関節内への投与後4週でのトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞が認められないことを示す図である。

図15は、試験例9における、比較例1で作製したHVJ-リボソーム-*control*の関節内への投与後4週でのトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞が認められないことを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明に使用される「HGF遺伝子」とは、HGFを発現し得る遺伝子をいい、当該遺伝子には、発現されるポリペプチドがHGFと実質的に同効である限り、その遺伝子配列の一部が欠失又は他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5'末端及び／又は3'末端に塩基が結合したような遺伝子も包含される。かかるHGF遺伝子としては、例えば、Nature, 342, 440 (1989)、特開平5-111383号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)などに記載のHGF遺伝子が例示され、これらの遺伝子を本発明で使用する事ができる。

HGF遺伝子は、適当なベクターに組み込んだものを使用する。例えば、後に挙げるウイルスの遺伝子にHGF遺伝子を組み込んだウイルスベクター、又はHGF遺伝子を組み込んだ適当な発現ベクターとして使用する。

本発明における「医薬」とは、HGFの有する薬理作用に基づいたヒトの疾患の治療剤又は予防剤をいい、例えば上記の治療剤又は予防剤が挙げられる。

本発明によってHGF遺伝子が細胞に導入された後、該細胞でHGFが発現され、そのHGFが薬理作用を示す。従って、本発明の医薬は、HGFの対象疾患と同様の対象疾患に有効である。

5 例えば、HGF遺伝子を細胞内に導入した場合、実施例に記載の様に、血管内皮細胞の増殖は促進されるが、血管平滑筋細胞の増殖は促進されない。さらに、実施例に記載のように、ラットを用いた動物実験において、生体内心臓にHGF遺伝子を導入した場合、血管新生が見られる。従って、HGF遺伝子は動脈疾患、特に血管平滑筋細胞の異常な増殖を主体とする障害に起因する各種疾患（例えば、血管拡張術（PTCA）後の再狭窄、動脈硬化症、末梢循環不全等）の治療・予防、心筋梗塞、心筋症、末梢性血管閉塞症、心不全などの疾患の予防・治療に有用である。なお、HGF自体も、血管内皮細胞の増殖は促進するが、血管平滑筋細胞の増殖を促進せず、同様の治療剤・予防剤として有用であり、HGF遺伝子による効果は、HGF自体の効果に基づくものである。

15 また、実施例に記載の様に、関節内にHGF遺伝子を導入すると、関節軟骨細胞の修復が促進され、プロテオグリカンを合成する細胞の増殖が促進される。従って、HGF遺伝子は種々の軟骨傷害、例えば骨形成異常症、変形性関節症、変形性椎間板症、骨折の修復・治癒不全、スポーツによる外傷、キーパンチャー病などの疾患の予防、治療に有効である。HGF自体も軟骨細胞の修復・増殖を促進し、同様の治療剤・予防剤として有用であり、HGF遺伝子による効果は、HGF自体の効果に基づくものである。

25 「リボソーム」とは、内部に水層を有する脂質二重層でできた閉鎖小胞体であり、その脂質2分子膜構造は生体膜に極めて近似していることが知られている。本発明のリボソームを製造する際に使用するリン脂質としては、例えばレシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジル酸等の酸性リン脂質、又はこれらのアシル基をラウロイル基、ミリストイル基、



5 オレオイル基等に置換したリン脂質、ホスファチジル・エタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等などがある。また、コレステロール等を添加することもできる。リポソームは、例えば通常の細胞膜中に存在する脂質など天然の材料から通常知られた方法で製造することができる。本発明の HGF 遺伝子を含有するリポソームは、例えば精製したリン脂質の薄膜を HGF 遺伝子を含有する溶液に懸濁し、超音波処理等を施して製造することができる。

10 また、本発明の HGF 遺伝子を含有するリポソームは、適宜ウイルス等と融合させて膜融合リポソームとしてもよい。その場合、ウイルスを、例えば、紫外線等で不活性化することが好ましい。特に好ましい膜融合リポソームとして、センダウイルス (Hemagglutinating virus of Japan:HVJ) と融合させた膜融合リポソームが挙げられる。この膜融合リポソームは、日経サイエンス、19  
15 44年4月号、32-38 頁、J. Biol. Chem., 266(6), 3361-3364 (1991)等記載の方法で製造することができ、例えば、紫外線照射等で不活性化した精製HVJとHGF遺伝子ベクターを含有するリポソーム懸濁液とを混合し、緩やかに攪拌した後、結合しなかったHVJをショ糖密度勾配遠心法で除去することにより、HVJ融合リポソーム (HVJ-リポソーム) を調製することができる。また、  
20 リポソームに、標的細胞に親和性を有するものを結合させて細胞への遺伝子導入効率を上げることができる。標的細胞に親和性を有するものとしては、例えば、抗体、レセプター等のリガンド等が挙げられる。

25 HGF 遺伝子の細胞内への導入方法としては、ウイルスベクターによるもの、及びその他のものに大別される (日経サイエンス、1994年4月号、20-45 頁、月刊薬事、36(1), 23-48 (1994)、及びこれらの引用文献等)。本発明の医薬においてはいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノ

ウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビス他のRNAウイルス等にHGF遺伝子を組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の導入方法としては、リボソーム法、リボフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、リボソーム法が特に好ましい。

また、HGF遺伝子を実際に医薬として作用させるには、HGF遺伝子を直接体内に導入するIn Vivo 法、及びヒトからある種の細胞を採取し体外でHGF遺伝子を該細胞に導入しその細胞を体内に戻すEx Vivo 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、及びこれらの引用文献等）。本発明の医薬においては治療目的の疾患、標的臓器等に応じて、適宜いずれかの方法を選択して適用することができる。

In Vivo 法は、Ex Vivo 法に比べて費用と手間が少なく、また簡便である。Ex Vivo 法は、HGF遺伝子の細胞内導入の効率がよい。

本発明の医薬において、In Vivo 法により投与する場合は治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与するか、又は腎臓、肝臓、肺、脳、神経等の疾患の対象部位に直接投与することができる。疾患部位に直接投与すれば、臓器選択的に治療することができる。例えば、「PTCA後の再狭窄」に対する遺伝子を用いる治療では、動脈内に投与することで実施でき（実験医学、12(15増刊)、1298-1933(1994))、好ましくはPTCAにおけるバルーンの先に本発明の医薬をつけて、血管にこすりつければそのまま血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞に導入することも可能である。

また、Ex Vivo 法による場合には、常法に準じ、ヒトの細胞（例えば、リンパ球、造血幹細胞等）を採取し、それに本発明の医薬を感作させて遺伝子導入を行った後、HGF 産生細胞をヒトへ戻すことが行われる。

5 In Vivo 法により投与する場合は、種々の製剤形態（例えば、液剤等）をと  
りうるが、一般的には有効成分であるHGF 遺伝子を含有する注射剤等とされ  
る。また、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。当該注射剤等は常法に  
10 より調製することができ、例えば、HGF 遺伝子を適切な溶剤（例えば、滅菌  
された水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅  
菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができ、またH  
GF 遺伝子に代え、HGF 遺伝子を組み込んだウイルスベクターを製剤化して  
もよい。さらに、HGF 遺伝子を包埋したリボソーム（又はHJV-リボソーム）  
15 においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリボソーム製剤  
の形態とすることができる。

製剤中のHGF 遺伝子の含量は、治療目的の疾患、標的臓器、患者の年齢、  
20 体重などにより適宜調製することができるが、通常HGF 遺伝子として0.0001  
mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1  
回投与するのが適当である。

### 20 実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの  
実施例によりなんら限定されるものではない。なお、使用した実験材料及び方  
法の概要は以下のとおりである。

### 25 実験材料及び方法

#### ①HGF 発現ベクター

HGF 発現ベクターの調製は、pUC-SR $\alpha$  発現ベクター（FEBS, 333, G

1-66 (1993))のEcoRIとNotIサイトの間にヒトHGF cDNA  
(2.2kb : Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321-327 (1990); 日本特許  
公開平5-111383)を挿入することにより行なった。このプラスミドベクターに  
5 おいて、HGF cDNAの転写はSR $\alpha$ プロモーターにより制御される (Na  
ture 342, 440-443 (1989))。

## ②細胞培養

10 ラットの冠動脈内皮細胞は、8週令のスプラグュードウリィ(SD)ラットの  
の心臓を酵素的に消化したものから密度勾配遠心法により単離した (Transpla  
ntation 57, 1653-1660 (1994))。ラットの大動脈平滑筋細胞(以下、VSMC  
Cという)は、12週令SDラットから酵素処理により得た (J. Clin. Invest.,  
15 93, 355-360 (1994))。これらの細胞は、10% (vol/vol)ウシ胎児血清、ペ  
ニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml)を含有す  
るDMEM培地で維持した。細胞は、37°C、95%空気-5%CO<sub>2</sub>の加湿  
雰囲気中、2日ごとに培地を交換してインキュベートした。これらの細胞は、  
免疫組織学的及び形態的観察により、それぞれ内皮細胞及び平滑筋細胞である  
ことが示された。

20 ヒト大動脈内皮細胞(5代継代)及びヒトVSMC(5代継代)は、クラボ  
社より入手したものをを用い、上記と同様な方法で、5%ウシ胎児血清、上皮成  
長因子(10 ng/ml)、塩基性繊維芽細胞成長因子(2 ng/ml)及びデキサメ  
サゾン(1  $\mu$ M)を含有するMCDB131培地で培養した。

25 なお、静止期の内皮細胞は、J. Clin. Invest. 86, 1690-1697 (1990); ibid.  
94, 824-829 (1994)に従って調製した。

## ③HVJ-リボソームのIn Vitro遺伝子導入

感作される内皮細胞又はVSMCは、10<sup>8</sup>個を6ウェルプレートに播種し、  
80%コンフルエンスまで増殖させた。細胞は、2 ml塩化カルシウムを含む平

5 衡塩類溶液 (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.6、以下「BSS」という) で3回洗浄し、実施例1で得たHVJ-リボソーム-DNA (2.5 mgの脂質及び10  $\mu$ gの包埋DNA含有) の溶液1 ml又は比較例1で得たHVJ-リボソーム-contの溶液1 mlを加え、4℃で5分間、さらに37℃で30分間インキュベートした。細胞は洗浄し、10%ウシ血清を含む新鮮培地中、CO<sub>2</sub> インキュベーターで維持した。

#### ④内皮細胞及びVSMCH中のHGF濃度の測定

10 感作される内皮細胞及びVSMCが産生するHGF濃度の測定はELISA法で行なった。即ち、ラット又はヒトの内皮細胞又はVSMCは6ウェルプレート (コーニング社製) に5  $\times$  10<sup>4</sup> 細胞/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し、24時間培養した。感作後24時間して、培地を交換し更に48時間培養した。HGFの放出を検討するため、感作された細胞 (感作48時間後) は洗浄し、インスリン (5  $\times$  10<sup>-7</sup> M)、トランスフェリン (5  $\mu$ g/ml) 及びアスコルベート (0.2 mM) を含有する無血清培地1 mlに加えた。24時間後、培養培地を集め、600 gで10分間遠心し、-20℃で保存した。

20 培地中のHGF濃度は、抗ラットHGF抗体又は抗ヒトHGF抗体を用いた酵素免疫法で測定した (Exp. Cell Res. 210, 326-335 (1994); Jpn. J. Cancer Res., 83, 1262-1266 (1992))。ウサギ抗ラット又は抗ヒトHGF IgGを、96ウェルプレート (コーニング社製) に4℃で15時間コートした。3%ウシ血清アルブミンを含むPBS (リン酸緩衝食塩液) でブロッキングした後、培養培地を各ウェルに加え、25℃で2時間インキュベートした。ウェルは、0.025% トゥイーンを含むPBS (PBS-トゥイーン) で3回洗浄後、ビオチン化ウサギ抗ラットHGF IgG又は抗ヒトHGF IgGを添加し、25℃で2時間インキュベートした。PBS-トゥイーンで洗浄後、ウェルは西洋ワサビ パーオキシダーゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (PBS-トゥイーン溶液) とインキュベートした。酵素反応は、基質溶液 (2.5 mM O-フェニ

レンジアミン、100 mM リン酸ナトリウム、50 mM クエン酸、0.015%過酸化水素含有)を添加することにより開始した。酵素反応は、1 M硫酸を添加することにより停止し、490 nmの吸光度を測定した。なお、抗ヒトHGF抗体はヒトHGFとのみ交差反応し、ラットHGFとは反応せず、また抗ラットHGF抗体はラットHGFとのみ交差反応し、ヒトHGFとは反応しない。

#### ⑤HGF

使用したヒト及びラット組換えHGFは、ヒト又はラットHGF cDNAを含む発現プラスミドで感作されたCHO細胞又はC-127細胞の培養液から精製したものを使用した (Cell, 77, 261-271 (1994); J. Clin. Invest. 93, 355-360 (1994))。

#### ⑥統計的解析

全ての実験は少なくとも3回行い、測定値は平均値±標準誤差で示した。測定値の統計的解析は、ダンカン法 (Duncan's test)で行った。

#### ⑦ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、アザン (Azan) 染色

HGF遺伝子を導入したラットを遺伝子導入後10日に、ヘパリンを加えた生理食塩水を灌流して屠殺し、引き続きPBSで調製した4%パラホルムアルデヒドによる固定を一晩行った。固定後にパラフィン包埋を行って切片を作製し、通常の方法によりHE染色、Azan染色を行った。顕微鏡下にて微小血管数を数えた。

#### 実施例 1

##### HGF発現ベクターを含有するHVJ-リポソームの調製

テトラヒドロフランに、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン及びコレステロールを重量比で1:4.8:2で混合した。テトラヒドロフランをロ

5      ーターエバポレーターで留去することで、この脂質の混合物（10mg）を容器壁に析出させた。ウシ胸腺から精製したHMG 1 核蛋白（high mobility group 1 nuclear protein）96  $\mu$ gとプラスミドDNA（300  $\mu$ g）のBSS（200  $\mu$ l）溶液と20℃で1時間混合し、次いで上記の脂質に添加した。リボソーム-DNA-HMG 1 複合体懸濁液はボルテックスで混合し、3秒間超音波処理をし、30分間攪拌した。

10      精製したHVJ（Z株）は、使用直前に3分間紫外線照射（110 erg/mm<sup>2</sup> sec）で不活性化した。上記で得られたリボソーム懸濁液（0.5 ml，脂質10mgを含有）とHVJ（20,000 hemagglutinating units）を全液量が4mlとなる様にBSSを加えて、混合した。この混合物を4℃で10分間インキュベートし、さらに37℃で30分間ゆっくりと攪拌した。融合していないHVJは、ショ糖密度勾配遠心法で、HVJ-リボソームから除去した。すなわち、ショ糖密度勾配における上層を集めることで、HGF発現ベクターを含有するHVJ-リボソーム（10  $\mu$ g/mlのHGF発現ベクターを含有する）を得た。以下、HGF発現ベクターを含有するHVJ-リボソームを、HVJ-リボソーム-DNAと称する。

## 実施例2

### 20      HGF発現ベクターを含有するHVJ-リボソームのラットへの投与

25      HGF発現ベクターを含有するHVJ-リボソームの調製は、HMG 1 核蛋白を64  $\mu$ g、プラスミドDNAを200  $\mu$ g用いて、実施例に記載の方法に従って行った。また、リボソーム懸濁液（0.5 ml，脂質10mgを含有）とHVJ（35,000 hemagglutinating units）を全液量が2mlとなる様にBSSを加えて混合した。

SDラット（400-500g；日本チャールズリバー社より購入）に対しベントバルビタール・ナトリウム塩（0.1 ml／100mg）を腹腔内投与して麻酔し、保温して自動呼吸器により呼吸を確保した。ラットに左側開胸術を施し、

HVJ-リボソームDNA又はHVJ-リボソーム-cont (20  $\mu$ l) を  
30Gの注射針を用いて、心尖に直接、慎重に注入した。

#### 比較例 1

##### HGF発現ベクターを含有しないHVJ-リボソームの製造

HGF遺伝子を含まないベクターに、実験例1記載の方法と同様の操作を行  
って、HGF発現ベクターを含有しないHVJ-リボソームの製造した。以下、  
HGF発現ベクターを含有しないHVJ-リボソームを、HVJ-リボソーム  
-contと称する。

#### 比較例 2

##### ヒトTGF- $\beta$ 発現ベクターを含有するHVJ-リボソームの調製

ヒトTGF- $\beta$ 発現ベクターを用いて、実施例1と同様にしてヒトTGF-  
 $\beta$ 発現ベクターを含有するHVJ-リボソームを調製した。

以下、ヒトTGF- $\beta$ 発現ベクターを含有するHVJ-リボソームを、HV  
J-リボソーム-DNA (TGF- $\beta$ ) と称する。

#### 試験例 1

##### HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞のHGFの発現

HVJ-リボソーム-DNA (リボソーム中のHGF発現ベクター濃度: 1  
0  $\mu$ g/ml) を、ラット冠動脈内皮細胞 (細胞数:  $10^8$  個) に感作し、HG  
Fの産生量をELISA法で測定した。また、対照として、HVJ-リボソ  
ーム-contを用いて、上記と同様な試験を行った。更に、非感作ラット冠動  
脈内皮細胞についてもHGF産生量を測定した (無処置群)。その結果を図1  
に示す ( $n=6$ )。図中、HGFはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラ



ット冠動脈内皮細胞群である。

図 1 に示されるように、HVJ-リボソーム-DNA を感作したラット冠動脈内皮細胞は高いレベルで HGF を産生し、分泌した。それに対して、無処置群及び HVJ-リボソーム-cont で感作したラット冠動脈内皮細胞群には、  
5 実質上、HGF 産生は認められなかった。

細胞数で測ってみると、HGF 発現群では有意に高い細胞数であった。

## 試験例 2

### 内皮細胞の増殖に対する感作された HGF の発現ベクターの効果

ヒト内皮細胞に HVJ-リボソーム-cont を感作し、外因的に添加した組換えヒト HGF の存在下 (1、10 及び 100 ng/ml) 又は非存在下に培養し、細胞数の増加率 (%) を測定した。その結果を図 2 (折線グラフ) に示す (n = 6)。図中、DSF は HVJ-リボソーム-cont を感作した内皮細胞群、HGF は所定濃度の組換えヒト HGF の存在下に培養した群を示す (\* : P < 0.05, \*\* : P < 0.01 対 DSF)。  
15

図 2 の折線グラフに示されるように、外因的に添加した HGF により内皮細胞の増殖は促進されることが明らかになった。

一方、HVJ-リボソーム-DNA (濃度 : 10 µg/ml) を感作した内皮細胞を培養し、細胞数の増加を測定し、増加率 (%) を求めた。また、対照として、HVJ-リボソーム-cont を感作した内皮細胞を培養し、細胞数の増加を測定し、増加率 (%) を求めた。その結果を図 2 (棒グラフ) に示す (n = 6)。図中、DSF は HVJ-リボソーム-cont を感作した内皮細胞群、HGF ベクターは HVJ-リボソーム-DNA を感作した内皮細胞群を示す (\*\* : P < 0.01 対 DSF、# : P < 0.05 対 HGF 100ng/ml)。  
20  
25

図 2 の棒グラフに示されるように、HVJ-リボソーム-DNA を感作した内皮細胞の増加率は対照に比べて著しく高く、また外因的に添加した HGF の効果に対しても有意に高いことが明らかになった。

更に、上記のHVJ-リボソーム-DNAを感作した内皮細胞の培養をウサギ抗ヒトHGF抗体の存在下又は非存在下に行ない、細胞数の増加を測定し、増加率(%)を求めた。また、対照として、HVJ-リボソーム-contを感作した内皮細胞を培養し、同様に細胞数の増加率(%)を求めた。なお、ウサギ抗ヒトHGF抗体は文献(Jpn. J. Cancer Res., 83, 1262-1266 (1992))に記載の方法により精製し、この抗体は10  $\mu$ g/mlの濃度において10 ng/mlの生物活性を中和することができる。更に、抗ヒトHGF抗体はヒトHGFとのみ交差反応し、ラットHGFとは反応せず、抗ラットHGF抗体はラットHGFとのみ交差反応し、ヒトHGFとは反応しない。また、正常ウサギ血清IgG (10  $\mu$ g/ml)をコントロールとして用いた。

その結果を図3に示す(n=6)。図中、対照はIgGコントロールの存在下に培養したHVJ-リボソーム-cont感作内皮細胞群；HGFはIgGコントロールの存在下に培養したHVJ-リボソーム-DNA感作内皮細胞群；HGF abはウサギ抗ヒトHGF抗体の存在下に培養したHVJ-リボソーム-DNA感作内皮細胞群を示す。なお、増加率(%)は、対照の増加率を100とした相対%で示した(\*: P<0.01対対照、#: P<0.05対HGF)。

図3に示されるように、抗ヒトHGF抗体の存在により、HVJ-リボソーム-DNA感作内皮細胞の増殖は抑制され、対照と同程度の細胞増加率であった。このことより、HGFは、内皮細胞の増殖因子であることが明らかになった。

### 試験例 3

#### HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清のラット冠動脈内皮細胞への効果

HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清を、静止期にあるラット冠動脈内皮細胞培養系(細胞数: 10<sup>5</sup> 個)に加え、3日間培

5 養し、当該内皮細胞数の増加を調べた。また、対照として、HVJ-リボソーム-*cont*を感作したラットVSMCの培養上清を用いて、同様にして内皮細胞数の増加を調べた。その結果を図4に示す( $n=6$ )。図中、対照はHVJ-リボソーム-*cont*を感作したラットVSMCの培養上清を添加した群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清を添加した群である。

図4に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清を添加した群においては、内皮細胞数の有意な増加がみられた。

10 上記のHVJ-リボソーム-DNA又はHVJ-リボソーム-*cont*を感作したラットVSMCの培養上清のHGF濃度を、抗ヒトHGF抗体及び抗ラットHGF抗体を用いたELISA法で測定した。また、非感作のVSMCの培養上清中のHGF濃度も測定した(無処置群)。

15 抗ヒトHGF抗体を用いた測定結果を図5に、抗ラットHGF抗体を用いた結果を図6に示す(いずれも $n=6$ )。図中、対照はHVJ-リボソーム-*cont*を感作したラットVSMCの培養上清群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清群である。

20 図5に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清にはHGFが検出され、その値は対照に対して有意に高かった。

また、図6に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの培養上清にはラットHGFも検出され、その値は対照に対して有意に高かった。

25 なお、図5及び図6に示されるように、無処理群及び対照群では培養上清中にELISA法で測定できる程度の量のHGFは存在しなかった。

#### 試験例4

HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清のラ

### ラット冠動脈内皮細胞への効果

HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を  
静止期のラット冠動脈内皮細胞培養系（細胞数： $10^5$  個）に加え、3日間培  
養し、当該内皮細胞数の増加を調べた。また、対照として、HVJ-リボソ  
ーム-contを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を用いて、同様に  
して内皮細胞数の増加を調べた。その結果を図7に示す。図中、AはHVJ-リ  
ボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群  
（ $n=8$ ）；BはHVJ-リボソーム-contを感作したラット冠動脈内皮  
細胞の培養上清を添加した群（ $n=8$ ）；Cは無処置群（ $n=15$ ）である。

図7に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動  
脈内皮細胞の培養上清を添加した群においては、内皮細胞数の有意な増加がみ  
られたのに対し、対照群では細胞数は無処置群と同程度であった。（対照群：  
 $0.117 \pm 0.002$ ，A群： $0.148 \pm 0.03$   $P < 0.01$ ）。

次に、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養  
上清に抗HGF抗体を加え、上記と同様に内皮細胞数の増加を調べた。そ  
の結果を図8に示す（ $n=8$ ）。図中、AはHVJ-リボソーム-DNAを感  
作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；BはHVJ-リボソ  
ーム-contを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清を添加した群；Cは  
HVJ-リボソーム-DNAを感作したラット冠動脈内皮細胞の培養上清に抗  
HGF抗体を添加した群；DはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラット  
冠動脈内皮細胞の培養上清にコントロール抗体を添加した群である。

図8のA及びCに示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを感作した  
ラット冠動脈内皮細胞の培養上清の細胞増殖促進活性は、抗HGF抗体を添加  
により完全に消失した。このことより、HVJ-リボソーム-DNAを感作し  
たラット冠動脈内皮細胞の培養上清の細胞増殖促進活性はHGFに起因するこ  
とが明らかになった。

## 試験例 5

HVJ-リボソーム-DNAを感作したヒトVSMCのヒト内皮細胞への効果

5 ヒトVSMC細胞培養インサート（コースター社製、孔径 $0.45\mu\text{m}$ ）に播種し、10%ウシ血清を添加したDMEM培地で増殖させた。一方、ヒト内皮細胞は、6ウェルプレートに播種し、10%ウシ血清を添加したDMEM培地で維持した。VSMCが80%コンフルエントになったときに、HVJ-リボソーム-DNA（リボソームの中のDNA含量： $10\mu\text{g}$ ）又はHVJ-リボソーム-contと4℃で5分間、次いで37℃で30分間インキュベートした。10 感作した後、感作VSMCを含むインサートを静止期のヒト内皮細胞を含むウェルに加えた。VSMCと内皮細胞とを、0.5%ウシ血清を含むDMEM培地中で3日間共培養し、WST-細胞数測定キット（ワコー社製）を用いて細胞数の測定を行なった。その結果を図9に示す（ $n=6$ ）。図中、対照はHVJ-リボソーム-contで感作したVSMCとの共培養群；HGFはHVJ-リボソーム-DNAで感作したVSMCの培養上清群である。

図9に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAで感作したヒトVSMCは、静止期にある非感作ヒト内皮細胞の増殖を有意に増加させることが明らかになった。

## 試験例 6

HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCのラット冠動脈内皮細胞への効果

25 HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMC（細胞数： $10^5$ 個）と静止期にあるラット冠動脈内皮細胞（細胞数： $10^5$ 個）とを、3日間共培養し、当該冠動脈内皮細胞の増加数を調べた。また、対照として、HVJ-リボソーム-contを感作したラットVSMCを用いて、同様に共培養して内皮細胞数の増加を調べた。その結果を図10に示す（ $n=6$ ）。図中、H

GFはHVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMC群、対照はHVJ-リボソーム-contを感作したラットVSMC群である。

図10に示される様に、HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCより放出されたHGFにより内皮細胞の増殖が刺激され、細胞数の増加が認められた（対照群： $0.126 \pm 0.006$ 、HGF群： $0.156 \pm 0.01$   $P < 0.05$ ）。

#### 試験例7

##### HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCの増殖

HVJ-リボソーム-DNAを感作したラットVSMCとHVJ-リボソーム-contを感作したラットVSMCをそれぞれ個別に培養し、細胞数の増加を比較検討したが、HVJ-リボソーム-DNAを感作は細胞増殖になんら影響は与えなかった。このことから、HGFにはVSMCに対する細胞増殖促進活性はないことが判明した。

#### 試験例8

##### HVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋における新生血管増生

HVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋、HVJ-リボソーム-contを直接注入したラット心筋及び無処置のラット心筋をHE染色、Azan染色し、検鏡して微小血管数を数えた。その結果を図11に示す。図中、HGFはHVJ-リボソーム-DNAを直接注入したラット心筋の微小血管数、対照はHVJ-リボソーム-contを直接注入したラット心筋の微小血管数である。

図11で示されるように、HVJ-リボソーム-DNAを注入したラット心筋では、HVJ-リボソーム-contを注入したラット心筋及び無処置のラット心筋と比較して、有意に微小血管数が増加した。このことは、内皮細胞増殖作用を持つHGFが生体において血管新生作用を持つことを示している。

## 試験例 9

HVJ-リボソーム-DNAを関節内に直接導入することによる関節軟骨の修復

5 10週齢のフィッシャーラットの大腿骨顆間部に直径1.8mmのキルシュナー鋼線を用い軟骨下骨を貫く損傷を作製した。術後1週の時点で、実施例1で作製したHVJ-リボソーム-DNA(100 $\mu$ l/膝)を直接的に関節内へ導入した。コントロールとして、比較例1で作製したHVJ-リボソーム-contおよび比較例2で作製したHVJ-リボソーム-DNA(TGF- $\beta$ )を同量関節内に投与した。これらの遺伝子等の導入後1、3、4週でラットを屠殺し、組織学的に修復部位を観察した。

10 その結果、図12に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAの関節内への投与後3週で修復組織の一部にトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞の出現を認めることができた。また、  
15 図13に示されるように、HVJ-リボソーム-DNAの関節内への投与後4週ではさらにプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞の出現範囲が広がる傾向を認めた。

図14に示されるように、比較例2で作製したHVJ-リボソーム-DNA(TGF- $\beta$ )の関節内への投与の場合には、投与後4週でこの様な軟骨様細胞の出現は認められなかった。また、図15に示されるように、比較例1で作製したHVJ-リボソーム-contの関節内への投与の場合には、投与後4週でこの様な軟骨様細胞の出現は認められなかった。

産業上の利用可能性

25 本発明の医薬は、HGFそのものの投与に比べ治療効果が持続的であり、また局所選択的に作用させることができるため、HGFの副作用を低減することが可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. HGF遺伝子からなる医薬。
2. HGF遺伝子を含有するリボソーム。
3. センダイウイルスと融合させた膜融合リボソームである請求項2記載のリ  
ボソーム。
4. 請求項2又は3記載のリボソームからなる医薬。
5. 動脈疾患治療剤である請求項1又は4記載の医薬。
6. 軟骨傷害治療剤である請求項1又は4記載の医薬。



## 図 面

図 1

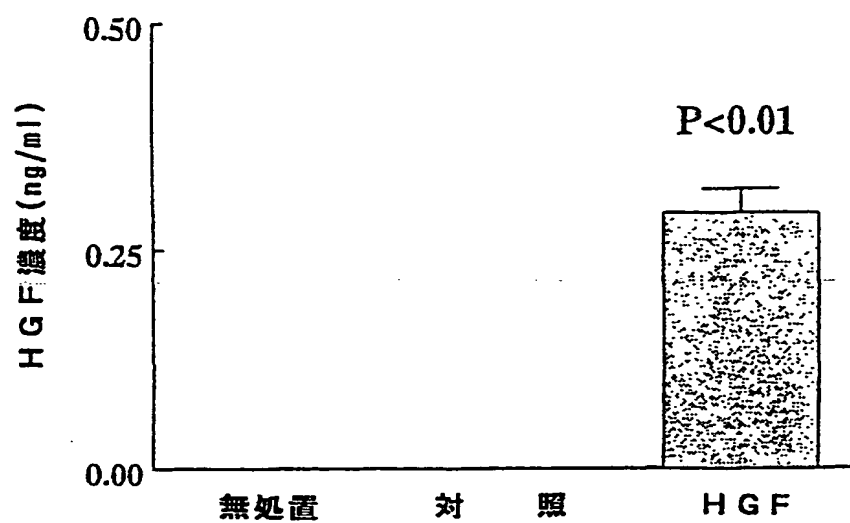


図 2

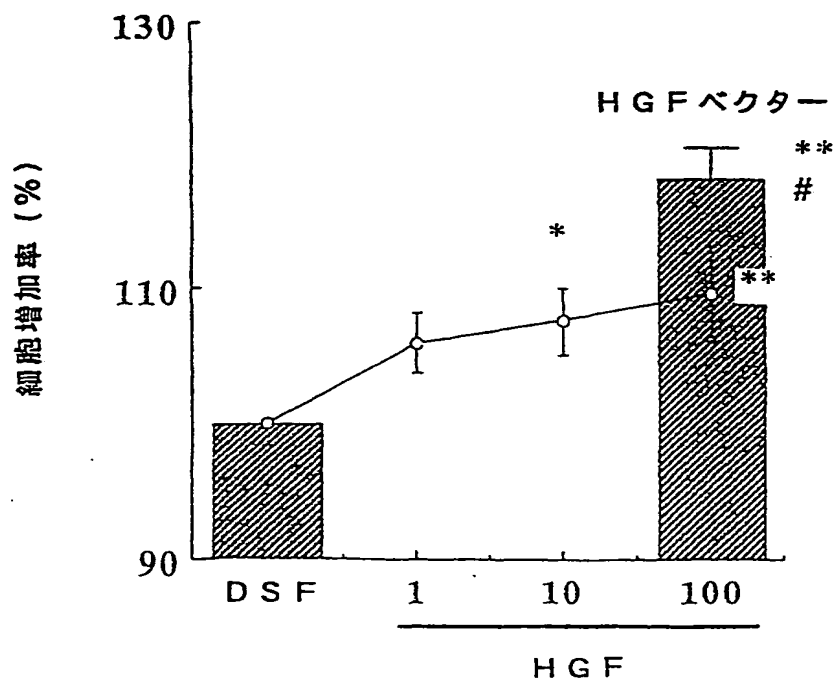


图 3

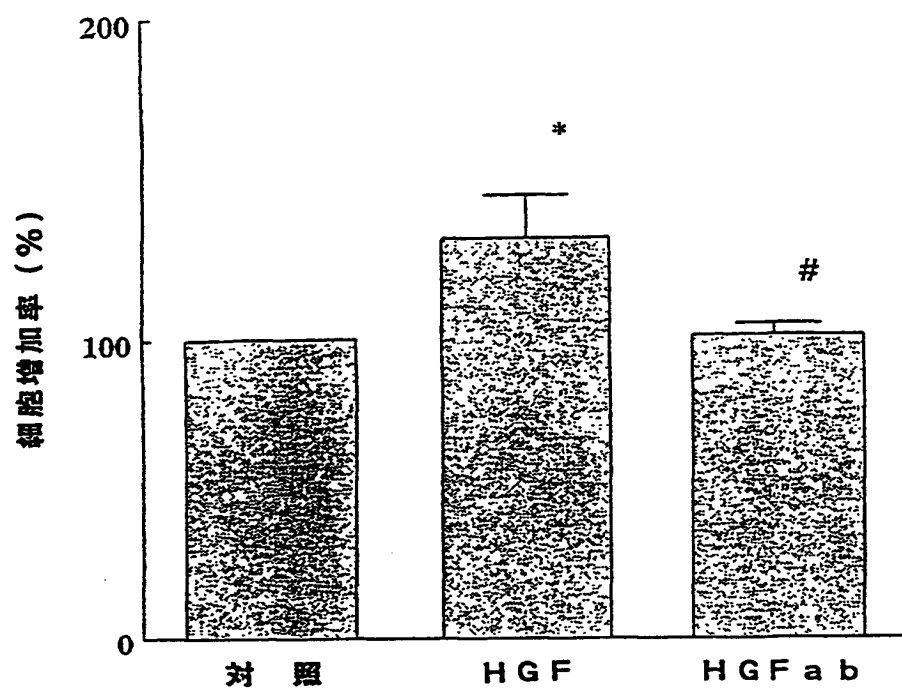


图 4

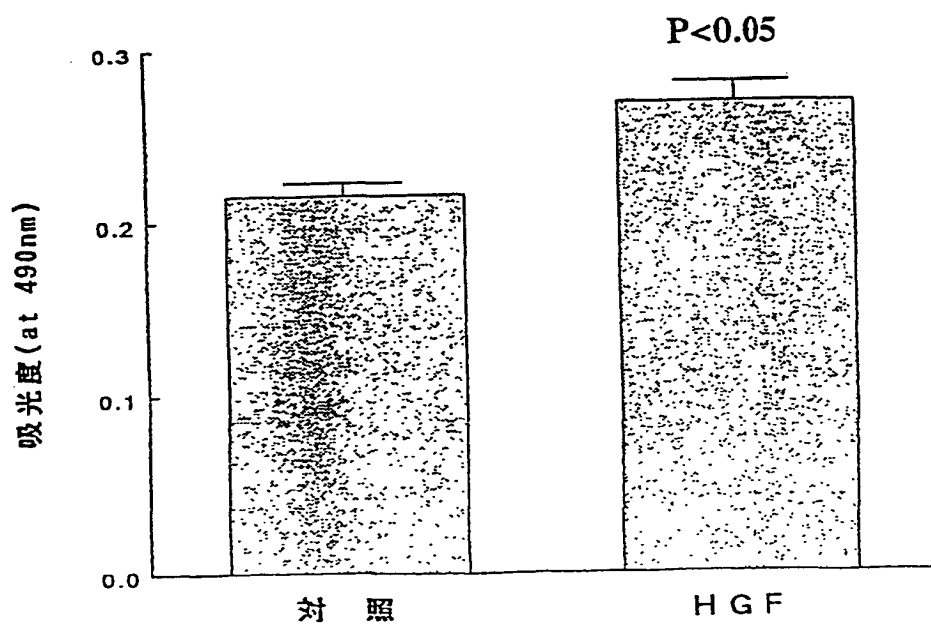


図 5

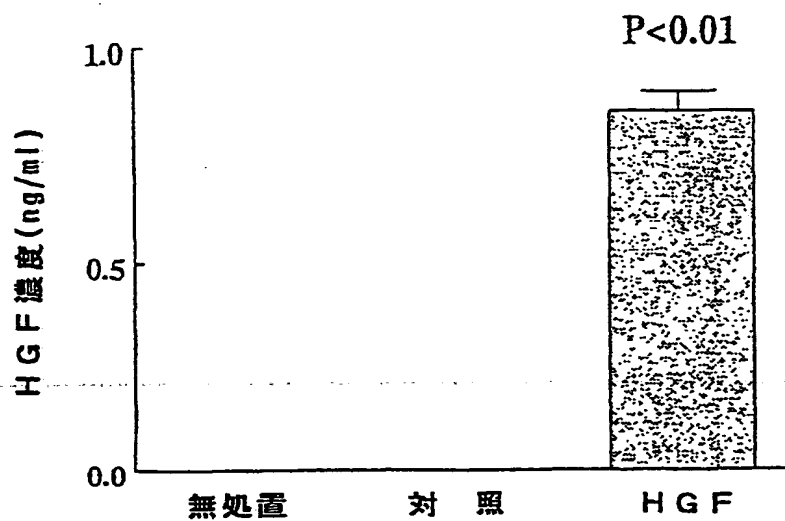


図 6

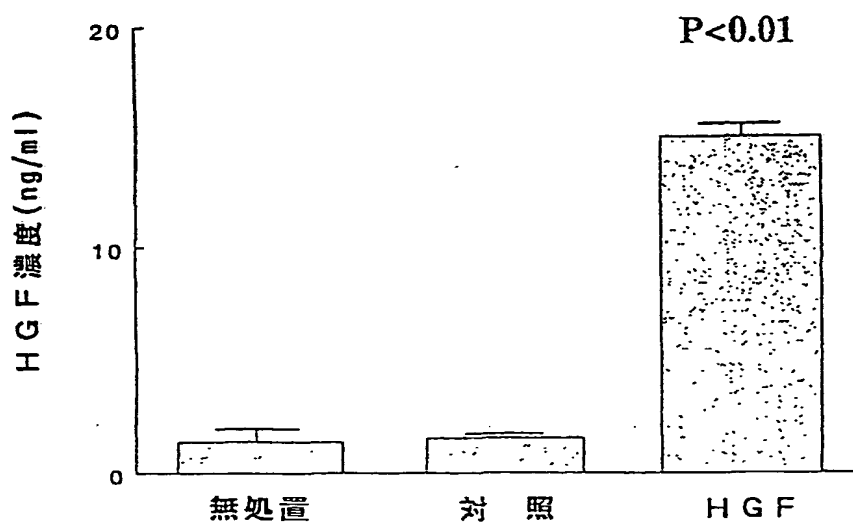


図 7

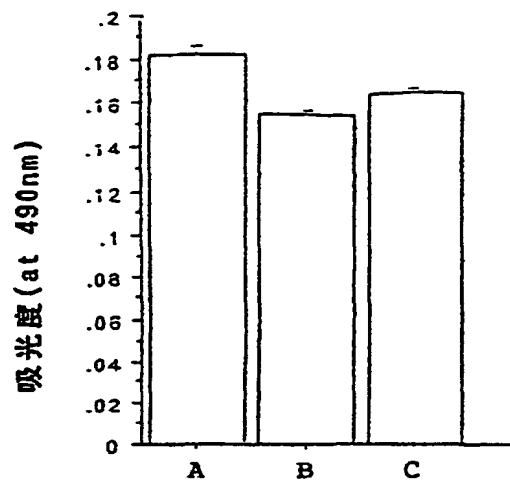


図 8

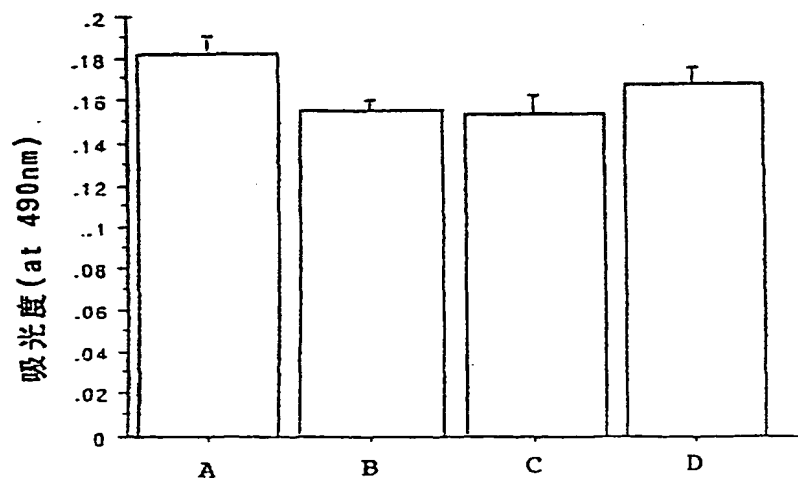


图 9

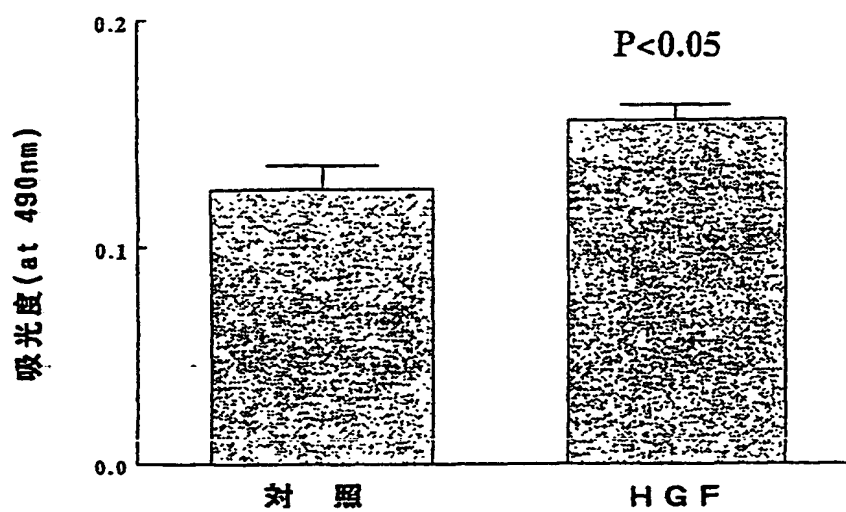


图 10

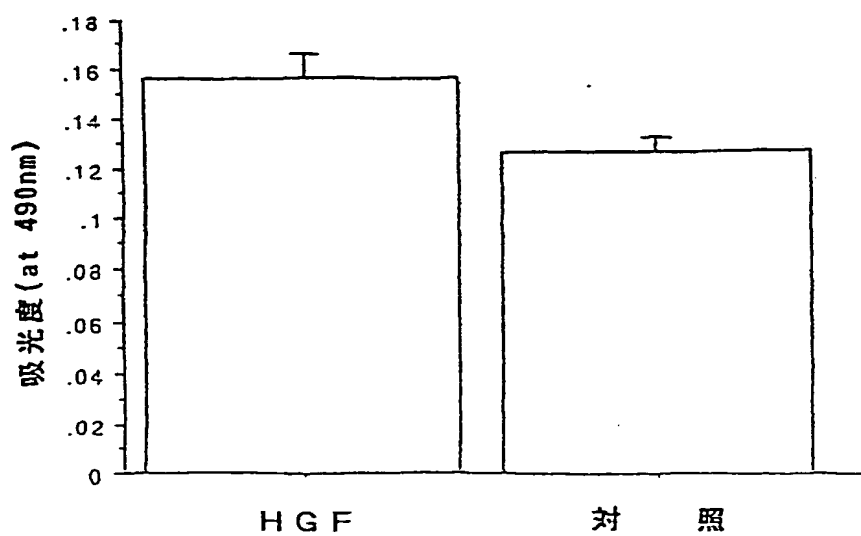
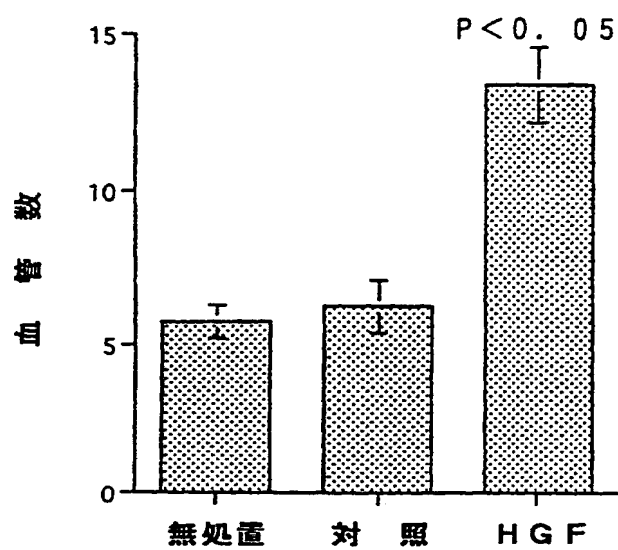
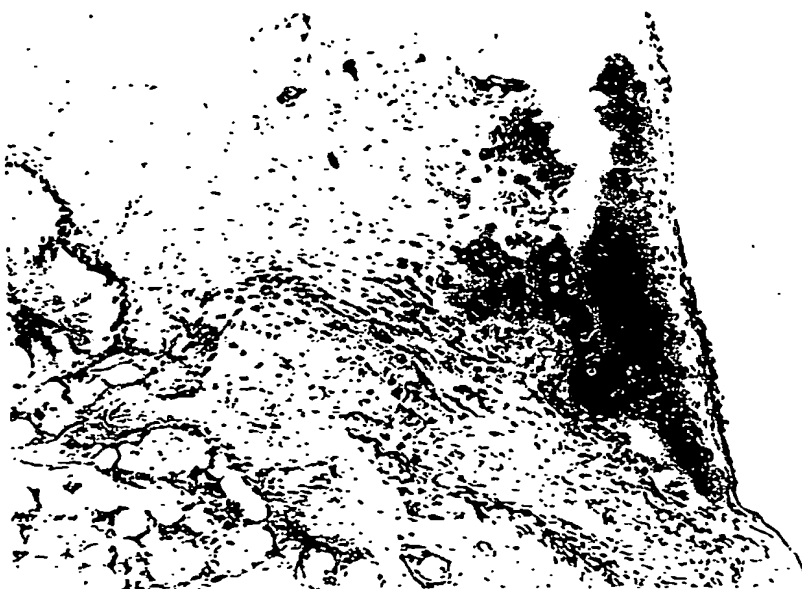
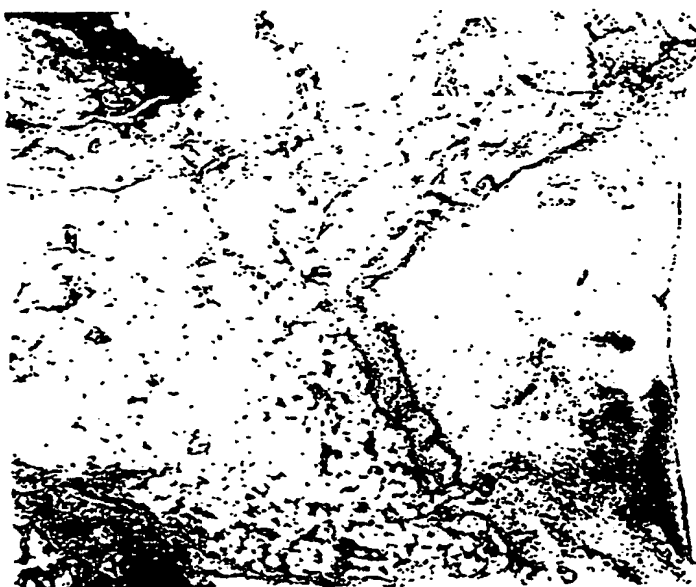


図 1 1

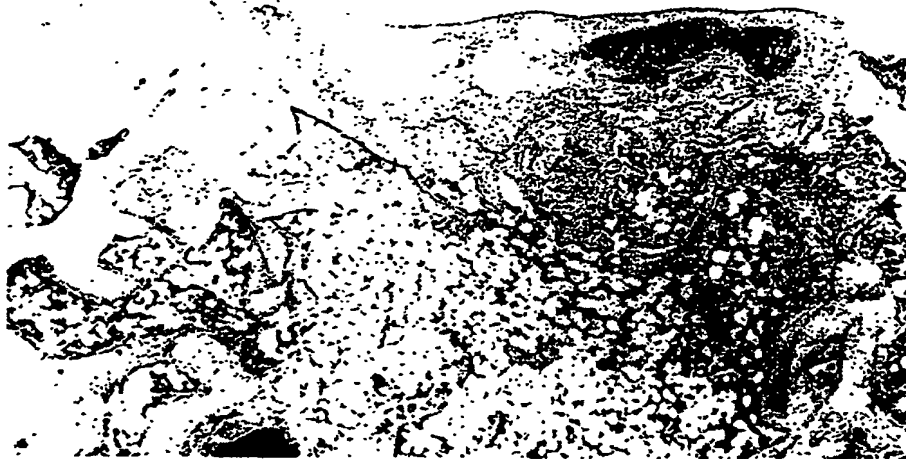


7/10

☒ 1 2

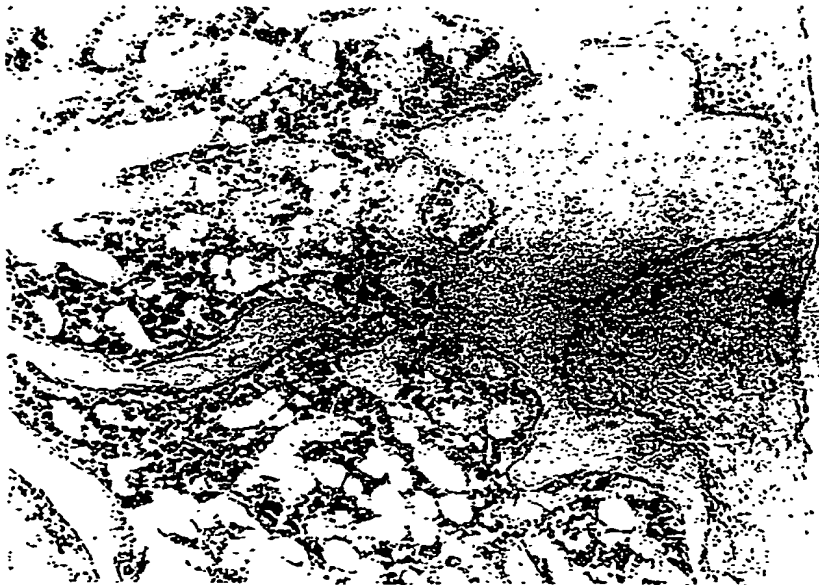


☒ 1 3



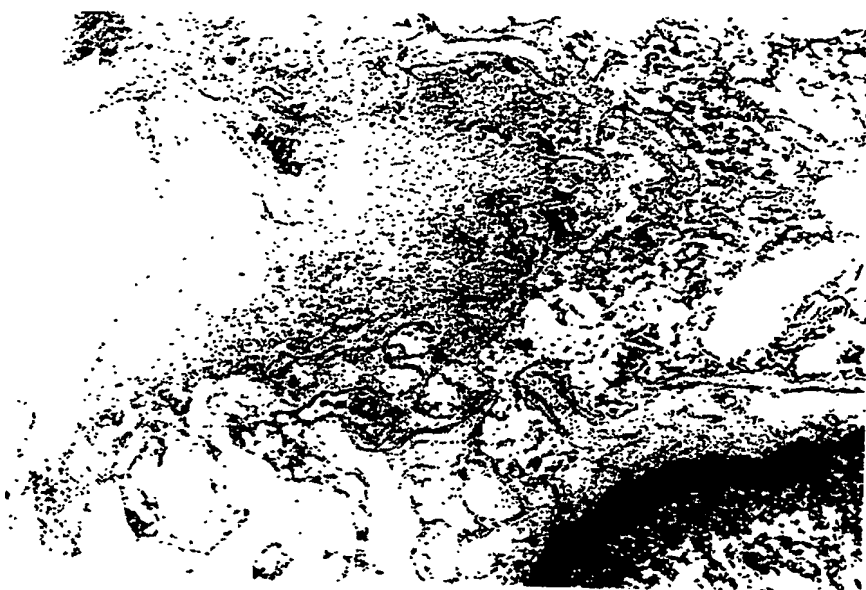


⊠ 1 4



10/10

15



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**